



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

“Efecto antifúngico – in vitro - del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Candida albicans* ATCC 90028”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Victor Hugo GARROTE GUTIERREZ

ASESOR

Lic. Elizabeth Irene PAREJA CUADROS

Lic. Roberto Eugenio ROJAS LEON (Co-asesor)

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Garrote V. “Efecto antifúngico – in vitro - del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Candida albicans* ATCC 90028” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2019.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica



"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN E IMPUDICIA"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Dr. Heli Jaime Barrón Pastor
Miembros: Dra. Vilma Ruth Béjar Castillo
Lic. Hanny Berenice Gonzales Hurtado
Asesor : Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 01 de marzo 2019, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado "**Efecto antifúngico – in vitro – del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Candida albicans* ATCC 90028**", para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del Bachiller:

VICTOR HUGO GARROTE GUTIERREZ

Habiendo obtenido el calificativo de:

.....18.....
(en números)

.....DIECIOCHO.....
(en letras)

Que corresponde a la mención de: **MUY BUENO**

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....
Presidente
Dr. Heli Jaime Barrón Pastor

.....
Miembro
Dra. Vilma Ruth Béjar Castillo

.....
Miembro
Lic. Hanny Berenice Gonzales Hurtado



.....
Asesor (a) de Tesis
Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros

**“Efecto antifúngico – *in vitro* - del aceite esencial de
Origanum vulgare (orégano) sobre *Candida albicans* ATCC
90028”**

AUTOR:

Bachiller, GARROTE GUTIERREZ, VICTOR HUGO

ASESORA:

LIC.TM ELIZABETH IRENE PAREJA CUADROS

Co-asesor:

LIC.TM ROBERTO EUGENIO ROJAS LEON

Dedicado a:

Mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme seguir adelante en las metas que me he propuesto.

A mis padres y hermanos por enseñarme a levantarme cada vez que me veían caer, brindándome palabras de apoyo y consejos de manera incondicional en el transcurso de mi vida.

A la Lic. Elizabeth Pareja por aceptar ser mi asesora, ayudarme y guiarme en este último tramo del proyecto. Además de brindarme sus vastos conocimientos de los aceites esenciales.

Agradezco encarecidamente al Lic. Roberto Rojas por brindarme su apoyo para la realización de esta tesis, así como también a todo el personal del servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño, al dejarme ejecutar mi tesis dentro de su ambiente de trabajo.

Y finalmente a todas las personas que me rodearon en este camino y pusieron su granito de arena, permitiéndome concluir esta tesis.

CONTENIDO

RESUMEN:	viii
1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES	2
1.2 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	3
1.3 OBJETIVOS	3
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	3
1.4 BASES TEÓRICAS	4
1.4.1 BASE TEÓRICA.....	4
1.4.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS.....	15
1.4.4 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	16
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO	18
2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	18
2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	18
2.1.3 POBLACIÓN.....	18
2.1.4 MUESTRA.....	18
2.1.5 VARIABLES:.....	19
2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.....	20
2.1.7 PROCEDIMIENTO Y ANALISIS DE DATOS.....	20
2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	24
2.1.9 BIOSEGURIDAD.....	24
3.0 RESULTADOS	27
4.0 DISCUSIÓN	32
5.1 CONCLUSIONES:	37
5.2 RECOMENDACIONES:	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	43

INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: EFECTO ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare</i> AL 100%, 75%, 50%, 25%, DMSO Y FLUCONAZOL	27
TABLA N°2: COMPARACIONES MULTIPLES DE HSD TUKEY.....	29

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: GRUPOS DE ESTUDIOS.....	19
FIGURA N°2: EFECTO ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare</i> AL 100%, 75%, 50%, 25%, DMSO Y FLUCONAZOL (25ug) FRENTE A CEPA DE <i>Candida albicans</i> ATCC 90028	28

RESUMEN:

Introducción: Las micosis ocasionadas por levaduras del género *Candida* generan afecciones de variable grado de severidad, desde infecciones cutáneas leves hasta candidiasis severas en pacientes inmunocomprometidos. El tratamiento más frecuente son los medicamentos de derivados imidazólicos; sin embargo, se ha visto un incremento de resistencia contra estos antifúngicos. El uso de plantas medicinales representa una alternativa al tratamiento. **Objetivo:** Determinar el efecto antifúngico - *in vitro*- del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) en *Candida albicans* ATCC 90028. **Diseño:** El presente estudio es experimental. **Materiales y métodos:** Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicótica en *Candida albicans* ATCC 90028 empleando aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) a las concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25 %. Se evaluó el efecto antifúngico mediante la técnica de disco difusión. Además, se trabajó con Fluconazol 25 ug y DMSO (Dimetilsulfoxido) como controles. **Población y muestra:** Estuvo conformada por 180 repeticiones de los grupos experimentales, conformada por 30 repeticiones de cada concentración del Aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100%, 75%, 50% y 25%, además de los controles (Fluconazol 25 ug y DMSO) en cepa estándar de *Candida albicans*. **Resultados:** Se halló un promedio de halo inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100% (\bar{x} =27,97 mm), aceite esencial de *Origanum vulgare* al 75% (\bar{x} =21,48 mm), aceite esencial de *Origanum vulgare* al 50% (\bar{x} =8,83 mm), aceite esencial de *Origanum vulgare* al 25% (\bar{x} =7,93 mm), el Fluconazol 25 ug (\bar{x} =28,57 mm) y DMSO (\bar{x} =6 mm) presentando las variables diferencia estadísticamente significativa mediante el test de ANOVA $p=0.00$. **Conclusión:** Al 95% de confianza estadística se comprobó mediante la prueba de ANOVA y prueba post hoc de comparaciones múltiples de HSD Tukey, que las medias de ambos grupos: el Fluconazol 25 ug y la concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100% fueron similares; sin embargo, el Fluconazol 25 ug presenta una diferencia de media superior con respecto al aceite esencial de *Origanum vulgare*.

Palabras Claves: Efecto antifúngico, aceite esencial, *Origanum vulgare*, *Candida albicans* ATCC 90028.

ABSTRACT

Background: Mycosis caused by yeasts of the *Candida* genus generate conditions of variable degree of severity, from mild cutaneous infections to severe candidiasis in immunocompromised patients. The most frequent treatment is drugs of imidazole derivatives; however, it has been an increase in resistance against these antifungals. The use of medicinal plants represents an alternative to treatment. **Objective:** To determinate the antifungal effect *-in vitro-* of the essential oil of *Origanum vulgare* (oregano) in *Candida albicans* ATCC 90028. **Design:** This investigation is experimental. **Materials and methods:** Antifungal susceptibility tests were performed on *Candida albicans* ATCC 90028 using *Origanum vulgare* essential oil at concentrations of 100%, 75%, 50% and 25%. The antifungal effect was evaluated by diffusion disc technique. In addition, 25 ug of Fluconazole and DMSO (Dimethylsulfoxide) were used as controls. **Population and sample:** The sample consisted of 180 repetitions of the experimental groups, consisting of 30 repetitions of each concentration of *Origanum vulgare* essential oil at 100%, 75%, 50% and 25%, in addition to the controls (Fluconazole 25 ug and DMSO) in standard strain of *Candida albicans* ATCC 90028. **Results:** An average inhibition halo was found for 100% *Origanum vulgare* essential oil (\bar{x} = 27.97 mm), 75% *Origanum vulgare* essential oil (\bar{x} = 21, 48 mm), essential oil of *Origanum vulgare* 50% (\bar{x} = 8.83 mm), essential oil of *Origanum vulgare* 25% (\bar{x} = 7.93 mm), *Fluconazole* 25 ug (\bar{x} = 28.57 mm) and DMSO (\bar{x} = 6 mm) presenting the variables statistically significant difference by means of the ANOVA test $p = 0.00$. **Conclusion:** 95% statistical confidence was confirmed by means of the ANOVA test and post hoc multiple comparison test of Tukey HSD, that the means of both groups: Fluconazol 25 ug and the concentration of the *Origanum vulgare* at 100% were equal; without However, Fluconazole 25 ug presents a difference of superior mean with respect to the essential oil of *Origanum vulgare*.

Keys words: Antifungal effect, essential oil, *Origanum vulgare*, *Candida albicans* ATCC90028.

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

La candidiasis es una infección causada por las levaduras del género *Candida*, encontrándose de forma saprofita en nuestro organismo; sin embargo, cuando sucede un desequilibrio en la homeostasis del hospedero, se puede comportar como un patógeno oportunista, causando enfermedades con un amplio espectro clínico. Estos efectos van desde infecciones cutáneas leves hasta candidiasis severas en pacientes inmunocomprometidos¹. En casos de Candidiasis invasiva, como la candidemia, se estima un incremento de su incidencia en países como Noruega, Dinamarca e Islandia de 2 a 3/100.000 habitantes por año², mientras que en población lactante afecta a 38,8 casos/100.000 menores de 1 año³.

En el Perú la prevalencia de *Candida albicans* es del 15,3%, mientras que la de *Candida no albicans* se ha ido incrementando con el tiempo teniendo actualmente importancia epidemiológica y un papel crucial en la dermatomycosis⁴. Los medicamentos de derivados imidazólicos son el tratamiento más frecuente para combatir la candidiasis, tópico o sistémico; sin embargo, existen factores que pueden incrementar un fracaso terapéutico como es el uso irracional de antimicóticos como profilaxis⁵.

Actualmente el acceso al tratamiento clínico representa un gran problema médico que afecta a las poblaciones de menores recursos debido al acceso limitado de medicamentos. Es así que la organización Mundial de la Salud (OMS), en su estrategia “Salud para todos en el año 2000”, acepta la necesidad de integrar a la salud pública los diversos recursos y técnicas de la medicina tradicional⁶.

El Perú es un país que cuenta con una gran diversidad de plantas medicinales. Muchas de estas ya han demostrado científicamente sus potenciales usos medicinales como es el caso de: la papa, la tara, el eucalipto y el tomillo principalmente⁷⁻¹⁰. El caso de *Origanum vulgare* (orégano) requiere especial atención debido a que científicamente se ha explorado su uso potencial como agente antibacteriano (*Porphiromonas*

*gingivalis*¹¹, *Staphylococcus aureus*¹², *Streptococcus mutans*¹³ y *E. coli*¹⁴) y antimicótico (*Candida albicans*)¹⁵

Es por ello que se plantea lo siguiente: ¿Existirá efecto antifúngico –*in vitro*- del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Candida albicans* ATCC 90028?

1.2 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.

Actualmente en el Perú existe una problemática económica que dificulta el acceso homogéneo de la población a los medicamentos. Una alternativa de menor costo son las plantas medicinales.

El orégano es una planta que presenta propiedades antifúngicas¹⁵, por lo tanto, su potencial uso en reemplazo de los medicamentos químicos resultaría muy beneficioso para gran parte de la población, quienes no cuentan con recursos económicos o con el acceso a los fármacos convencionales, frente a infecciones fúngicas.

Es por ello que es necesario desarrollar estudios en el Perú que evalúen según la guía internacional del CLSI M44 A, la susceptibilidad de *Candida albicans* empleando el poder anti fúngico de *Origanum vulgare*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto antifúngico –*in vitro*- del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Candida albicans* ATCC 90028.

1.3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.

- Determinar el efecto antifúngico –*in vitro*- del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) al 75% sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028.
- Determinar el efecto antifúngico –*in vitro*- del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) al 50% sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028.
- Determinar el efecto antifúngico –*in vitro*- del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) al 25% sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028.
- Comparar el efecto antifúngico –*in vitro*- del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) y Fluconazol(25ug) sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028.

1.4 BASES TEÓRICAS

1.4.1 BASE TEÓRICA

1.4.1.1 *Candida*

Es un microorganismo unicelular, Gram positivo, considerado como un hongo dimórfico debido a que en estado saprófito se encuentra en forma de levadura y en estado parasitario presenta la forma de pseudohifa. La levadura tiene forma redonda u ovalada de 2-4 um, mientras que la forma filamentosa presenta un conjunto de células divididas por septos originadas por blastosporas¹⁶

1.4.1.2 Factores de virulencia

- **Morfogénesis:** Es una condición reversible entre levadura (unicelular) y la forma de crecimiento filamentoso de *Candida albicans*. Produciendo cambios en el comportamiento de la superficie celular, así como también en la apariencia de las colonias, atributos metabólicos, bioquímicos y moleculares, dándole propiedades más virulentas durante la infección¹⁷.

- **Capacidad de adherencia a diferentes superficies:** *Candida albicans* es muy versátil para adherirse a una variedad de superficies como células endoteliales, epiteliales y materiales inertes implantados en el cuerpo del hospedero. Para ello hace uso de unas moléculas llamadas adhesinas quienes incluyen a proteínas de secuencia similar a la aglutamina (ALS), proteína de pared hifa (Hwp1), proteínas ligadas a GPI(glicosilfosfatidilinositol), entre otros^{17,18}.
- **Producción de enzimas hidrolíticas:** Entre ellas encontramos a las proteinasas y fosfolipasas específicas de cada cepa. En *Candida albicans* se han detectado 10 isoenzimas con actividad proteinasa conocida como Sap (secreted aspartic proteinase), de las cuales Sap 1, Sap3 y Sap-6, son importantes en la infección oral mientras que Sap1-Sap2 están implicados en la infección vaginal. Así mismo, dentro de las fosfolipasas sólo la PLB1 muestra virulencia en el modelo animal¹⁷.
- **Aumento del pH:** *Candida albicans* tiene la capacidad de adaptarse y modular el pH extracelular, alcalinizando su entorno circundante bajo inanición de nutrientes, para luego auto inducirse la forma de hifas¹⁸.
- **Formación de biopelículas:** Esta biopelícula está conformada por una densa red de levaduras y pseudohifas, caracterizándose por poseer un aumento en la resistencia a los antifúngicos y dar protección contra las defensas del hospedero^{17,18}.

1.4.1.3 Candidiasis

Es una infección ocasionada por levaduras del género *Candida*, siendo *Candida albicans*, la especie encontrada con mayor frecuencia^{1,3}; sin embargo, pueden estar implicadas otras especies de *Candida*, como: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, entre otras. Las infecciones causadas por esta levadura presentan un amplio espectro de presentaciones clínicas llegando en ocasiones a desarrollar en el hospedero lesiones cutáneas, muco cutáneas, profundas, generalizadas y de alta severidad como es el caso de la candidiasis invasiva^{1,19}.

1.4.1.5 Principales tipos de candidiasis

Candidiasis orofaríngea: Es una de las infecciones oportunistas más frecuentes en pacientes con VIH, siendo *Candida albicans* la especie más asociada a este tipo de infecciones¹⁸⁻²⁰; no obstante, se ha ido identificando cada vez más otra especie de *Candida* no *albicans*: *C. dubliniensis*, adquiriendo protagonismo en los últimos años. Sin embargo, esta especie presenta cierta restricción de invadir tejidos más profundos debido a la incapacidad de convertirse a una forma filamentosa¹⁹.

Candidiasis vulvovaginal: La vulvovaginitis ocasionada por las levaduras del género *Candida* es la razón más frecuente de consulta ginecológica, siendo *C. albicans* la especie mayormente encontrada con un 70-75% en mujeres fértiles²¹; sin embargo, se ha visto un incremento de infecciones por especies no- *albicans* como: *C. glabrata* (10-20%)^{20,21}, la cual ocupa un segundo lugar en la colonización de la mucosa vaginal. Así mismo, el principal mecanismo de patogenicidad es la adherencia, expresándose mejor en *C. albicans* quien aprovecha los cambios en el entorno del hospedero para acceder al lumen vaginal desde la zona perianal²¹.

Candidiasis cutánea: Se puede presentar como una infección subaguda o crónica, causada por una infección secundaria de la piel y uñas (pliegues corporales) en pacientes predispuestos¹⁹. Es así que la forma filamentosa de *Candida albicans* penetrar las barreras tisulares debido a la secreción de enzimas con capacidad proteolítica y lipolítica¹⁸.

Candidemia: Asociada con una alta mortalidad del 30 al 40%, siendo *Candida albicans* la cuarta causa principal de hospitalización; no obstante, las especies de *Candida* no *albicans* se han incrementado, siendo *C. tropicalis* aislado en pacientes neutropénicos y con leucemia aguda²⁰.

Candidiasis diseminada o Sistémica: Presentándose en pacientes en estado crítico, generalmente neutropénicos, ocasionando una diseminación de las células de *Candida* creando abscesos en órganos de vital importancia²⁰

1.4.1.6 Mecanismos de resistencia antifúngica a los azoles

Existen dos mecanismos de resistencia a los azoles que puede presentar las cepas de *Candida albicans*. Estos son la modificación de la enzima que realiza la síntesis del ergosterol y la alteración en las bombas de expulsión ATP- binding cassette (ABC) y facilitadores mayores (MF)⁵.

- **Modificación de la enzima relacionada en la síntesis del ergosterol:** Los azoles actúan sobre la síntesis de 14 a lanosterol desmetilasa ocasionando un acumulo de 14 a metil esteroides modificando la función y fluidez de la membrana⁵. En las especies de *Candida* la sobre expresión del gen ERG11 causa un incremento de la enzima lanosterol 14 a desmetilasa resultando en un aumento de la síntesis del ergosterol que supera la capacidad del fármaco antifúngico volviéndose resistente²².
- **Modificación de las bombas de expulsión: ATP-binding cassette (ABC) y Facilitadores Mayores (MF)⁵:** Son un sistema de bombas que requieren de ATP para poder expulsar el fármaco del interior de la célula, contribuyendo así a la resistencia a casi todos los azoles. Los transportadores implicados en este tipo de resistencia son sintetizados por los genes CDR y MDR. Además, se ha reportado que la resistencia a todos los azoles está dado por la expresión elevada de las bombas de expulsión, mientras que la menor susceptibilidad al fluconazol es generado por la expresión elevada de los genes MDR⁵.

1.4.1.7 Plantas medicinales

Las plantas medicinales son aquellas cuyas partes o extractos son utilizados como medicamentos o drogas para el tratamiento de alguna afección o enfermedad²³. Es por ello que han sido utilizadas por nuestros ancestros por varios años, sobre todo en la medicina tradicional.

Su forma de aplicación puede variar, siendo la infusión o cocción la más frecuente lo que da origen a una tisana; aunque también existen otras formas de uso como: comprimidos, cápsulas, cremas, decocción, infusión, jarabe, pomada, tinturas, ungüento entre otras²³.

1.4.1.8 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios cuya estructura química está conformada por complejos de hidrocarburos y sus derivados oxigenados. La presencia de estos componentes determina sus propiedades físicas, como ser líquido a temperatura ambiente, solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua, así como también sus propiedades biológicas como: antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígeno, agente potenciador de la inmunidad y agente neurofarmacológico^{24,25}.

1.4.1.9 Extracción del aceite esencial

Solventes orgánicos

La muestra es secada y molida, posteriormente se coloca en contacto con disolventes orgánicos como alcohol y cloroformo. El producto final es una oleorresina conformada por esencias vegetales, grasas y ceras. La ventaja de este procedimiento es ser muy sencillo; sin embargo, presenta ciertas desventajas como: riesgos de inflamación, toxicidad al inhalarlos, el producto obtenido es más oscuro debido al arrastre con algunos pigmentos además de presentar trazas con el disolvente utilizado²⁷.

Extracción por fluidos supercríticos

Se hace empleo de gases como disolvente, pero en condiciones por encima de su temperatura y presión críticas, logrando una alta selectividad de microcomponentes valiosos en productos naturales. Presenta muchas ventajas como: reducir el tiempo de extracción, obtener rendimientos mayores y la selección de sustancias a extraer, aunque presenta la desventaja de requerir equipos complejos y extraer compuestos de alto peso molecular junto con los aceites esenciales²⁷.

Destilación por arrastre de vapor^{13, 26}:

El fundamento del método²⁵⁻²⁸ es que las esencias de los aceites son llevadas en un flujo de vapor, generado por una fuente de energía. Este extracto, aceite y agua de vapor, es concentrado cuando pasa por un enfriador de vidrio, siendo recogidos en un recipiente del mismo material. Posteriormente, se obtiene la presencia de dos fases inmiscibles al culminar la destilación (orgánica y acuosa) donde finalmente se procede a la separación del producto.²⁶

La realización de este método destaca por ser simple y económico, pero presenta el inconveniente de requerir largos períodos de tiempo para su extracción y presentar rendimientos bajos en comparación con otros métodos, como: la extracción con solventes inorgánicos, extracción con fluidos supercríticos y la extracción por microonda²⁶.

1.4.2.0 *Origanum vulgare* (Orégano)

- ***Origanum vulgare*:**

Es una planta herbácea cuyo nombre deriva del griego "oros" (montaña) y "ganos" (adorno), denotando el aspecto hermoso de sus flores en las montañas, o de "origanon" que significa hierba amarga²⁹.

Esta planta comprende varias especies, siendo los de mayor ocurrencia el *Origanum vulgare*, originario de Europa, y el *Lippia graveolens*, originario de México²⁶. El orégano perteneciente al género *Origanum*, familia Labiatae, se caracteriza por ser una planta herbácea, rústica y perenne creciendo como una mata. Además, puede desarrollarse en un amplio rango de altitudes y temperaturas; sin embargo, el mayor porcentaje de aceites esenciales se obtienen en zonas con temperaturas frías³⁰.

- **Clasificación sistémica³¹:**

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Origanum* L

Especie: *Origanum vulgare* L

Nombre vulgar: Orégano

- **Descripción botánica de *Origanum vulgare***

Es una planta aromática, leñosa en la base, que presenta un tamaño hasta de un metro de altura³². Sus hojas, son ovaladas con vellosidades en el envés y con su superficie punteada presentando glándulas esferoidales que contienen las esencias. Presenta flores diminutas, de color blanco o rosa que nacen formando inflorescencias³³.

Distribución geográfica

Distribución mundial:

El orégano es una planta oriunda del Mediterráneo de Europa; sin embargo, crece de forma espontánea en el norte de África, y Asia³³. En América latina los principales productores son: México, Brasil, Chile y Costa rica³⁰.

Distribución en el Perú:

En el Perú el principal departamento productor es Tacna, seguido por Moquegua, Ancash y Arequipa³⁰.

Hábitat

Crecen en regiones subtropicales con temperatura de hasta 32C°. Adecuándose a cualquier tipo de suelo, evitando que sea salino, siendo los suelos arenosos, francos, arcillosos, permeables y ricos en materia orgánica los que presentan un mejor rendimiento^{30,34}.

1.4.2.1 Composición química del orégano

A propósito de su constitución química, muchos autores están de acuerdo que esto puede verse afectada por varios factores, como: el clima, la altitud, la temporada de cosecha, el estado de crecimiento del cultivo, el método de extracción y de las diferentes especies del orégano^{26-28,35}.

Dentro del género *Origanum* podemos encontrar en su mayoría los fenoles (timol y carvacrol) y en cantidades menores los hidrocarburos monoterpénicos (limoneno, α y β -pineno, p-cimeno), sesquiterpénicos (β -cariofileno y β -bisaboleno), linalol y terpinen-4-ol. Además, entre otros componentes podemos encontrar ácidos fenólicos (cafeico, rosmarínico y clorogénico), taninos, principios amargos, flavonoides y triterpenos derivados de los ácidos ursólico^{26,35}.

Carvacrol

Es un fenol monoterpénico con un alto poder hidrofóbico, presente en numerosas especies del *Origanum* como: *Origanum onites*, *Origanum dictamnus*, *Lippia graveolens*, *Thimus vulgaris* entre otras^{26, 36}. Este componente presenta varias propiedades biológicas y farmacológicas^{35, 36}. Además, ha recibido un gran interés por parte de muchos investigadores por su amplio espectro antimicrobiano frente a bacterias Gram negativas, Gram positivas y levaduras, entre ellos: *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocitogenes*, *Salmonella entérica serovar typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* entre otros³⁶. En *Bacillus cereus*, el carvacrol redujo el potencial de

membrana citoplasmática, disminuyendo el pH intracelular e inhibiendo la síntesis de ATP con posterior salida del potasio³⁷.

Timol

Es un fenol cuya estructura química es similar a la del carvacrol diferenciándose en la posición del grupo hidroxilo, es por ello que su mecanismo de acción es semejante a este último³⁸. Por otra parte, diversas investigaciones reportan que la presencia y la concentración elevada de timol en el aceite esencial de *Origanum*, se debe a la actividad de la enzima terpeno-sintetasa la cual regula la conversión de terpineno a timol³⁹.

El timol presenta efecto antimicrobiano actuando a nivel de la membrana celular, facilitando la filtración de componentes químicos importantes para el metabolismo, tales como, ácidos nucleicos, aminoácidos, ATP e iones⁴⁰.

1.4.2.2 Pruebas de susceptibilidad antifúngica

En sus inicios las investigaciones de susceptibilidad antifúngica eran métodos poco normatizados, irreproducibles e incongruentes, debido a diversas causas que intervienen en estos ensayos como: la constitución y concentración de iones hidrógenos del medio, el volumen del inóculo, configuración del test y los grados centígrados de incubación^{41, 42}.

En 1992 el antiguo comité del CLSI, publicó una guía internacional para la estandarización de susceptibilidad de levaduras basado en un método de macrodilución^{42, 43}. Luego en 1997 se aceptó este documento (M27-A), que establece "cut off" para itraconazol, fluconazol y 5-Fluorocitocina, además del CIM en cepas estandar⁴¹. Por otro lado, en Europa se formó la European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), la cual creó un protocolo (EDef 7.1) equivalente al estándar CLSI para levaduras no fermentadoras⁴⁴.

- **Método de disco difusión:** Este método tiene por finalidad el estudio de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos, en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Es un método que se caracteriza por ser simple y económico; siendo el procedimiento el mismo que para las bacterias, presentando algunas modificaciones como el añadido de azul de metileno al 0.5 ug/mL y glucosa anhidra 2% en el medio de cultivo. La preparación del inóculo donde se realiza el crecimiento de las levaduras a partir de una placa de agar sabouraud dextrosa (ASD) y las lecturas de los resultados puede variar entre 24 horas y 48 horas según la especie de levadura. La principal desventaja de este método es que solo existen puntos de corte para voriconazol y fluconazol⁴¹.
- **Método de dilución:** Es el gold standar que evalúa la sensibilidad in vitro, de hongos levaduriformes y filamentosos, este método permite medir la CIM de antifúngico, como: anfotericina B, fluocitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y los nuevos triazoles como: voriconazol, posaconazol y ravuconazol⁴².

El procedimiento de este método es incorporar volúmenes fraccionados del antimicrobiano a evaluar en caldo RPMI sin bicarbonato con glutamina; posteriormente estos medios son inoculados con el agente fúngico de prueba incubándose a 35°C por 48 horas para las especies de *Candida* y 72 horas para *C. neoformans*⁴¹. La lectura se toma como la cantidad mínima del agente antifúngico capaz de inhibir la multiplicación y producción del crecimiento visible de una cepa fúngica. Los inconvenientes de los test de sensibilidad en dilución son: el requerimiento de un periodo largo de tiempo en donde se reporta el resultado, la existencia de fallas en diferenciar cepas con menor susceptibilidad a anfotericina B, la no disponibilidad para implantar los puntos de cortes de los antifúngico a varios hongos y difícil interpretación en cepas con *trailing* para fluocitosina y azoles⁴².

- **Métodos comerciales:** El método del Etest®, es una prueba disponible para determinar resistencia antifúngica, consiste en inocular el hongo a estudiar en la superficie del agar, para luego colocar una tirilla de plástico embebido en concentraciones graduadas del fármaco permitiendo evaluar el CIM⁴³. Seguidamente, se incuba a 37°C por 24-48 horas generando una elipse de inhibición obteniéndose el CIM⁴².

Existen otros métodos comerciales, por ejemplo: los basados con la técnica de dilución con volúmenes pequeños, Sensitre Yeast One, que presentan sustratos cromogénicos, el cual mejora la lectura del CIM. Sin embargo, recientemente está disponible el Vitek2® (Biomerieux), equipo automático que emplea haces de luces espectrofotométricas para permitir la determinación del CIM y a su vez presenta la ventaja de poder identificar a las levaduras⁴².

1.4.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Efecto antifúngico:** Es la capacidad de ciertas sustancias para evitar el crecimiento o desarrollo de algún tipo de hongo, provocando incluso su muerte.
- **Aceite esencial:** Compuesto volátil producto del metabolismo secundario de las plantas.
- ***Origanum vulgare*:** Planta herbácea perteneciente al género *Origanum*.
- ***Candida albicans* ATCC 90028:** Cepa de referencia certificado para el control de calidad.
- **Halo inhibitorio:** Espacio periférico en el disco impregnado con solución antimicrobiana en donde no hay crecimiento de ningún microorganismo.

- **Candidiasis:** Infección ocasionado por levaduras del género *Candida*.
- **Destilación por arrastre con vapor de agua:** Método de extracción para separar compuestos orgánicos insolubles en agua y ligeramente volátiles.

1.4.4 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Ho: El aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) no presenta efecto antifúngico-*in vitro*- sobre *Candida albicans* ATCC 90028.

H1: El aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) presenta efecto antifúngico-*in vitro*- sobre *Candida albicans* ATCC 90028.

CAPITULOS II: MÉTODOS

2.1 DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Por el tipo de investigación, el estudio presenta un enfoque cuantitativo de tipo explicativa debido a que trata de buscar una razón del comportamiento de la variable, teniendo como fin el descubrimiento de las causas.

2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio es experimental y con grupo control, debido a que en estos tipos de estudios el investigador manipula la variable independiente (concentración del aceite esencial del orégano) además de tener más de dos grupos experimentales para establecer comparaciones (aceite esencial de orégano al 100%, 75%, 50% y 25%), así como también presenta un grupo control positivo (Fluconazol) y negativo (DMSO).

2.1.3 POBLACIÓN

La población estará conformada por la cepa estándar de *Candida albicans* ATCC 90028, la cual proviene del Servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño(INSN).

2.1.4 MUESTRA

Para *Candida albicans* ATCC 90028, se utilizará el programa G*power 3.1.9.2 para hallar el tamaño muestral óptimo (**Anexo N°1**). Datos:

Efecto del tamaño F: 0.3399346

Desviación estándar: 5.0

Nivel de confianza: 95%

N° de grupos experimentales:

Potencia	Tamaño de la muestra						Total
	Aceite esencial 100%	Aceite esencial 75%	Aceite esencial 50%	Aceite esencial 25%	Control Positivo Fluconazol 25 ug	Control Negativo DMSO	
80%	30	30	30	30	30	30	180

En resumen, el tamaño de la muestra son 180 repeticiones de los grupos experimentales, conformada por 30 repeticiones del Aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100%, *Origanum vulgare* al 75%, *Origanum vulgare* al 50% y *Origanum vulgare* al 25%), además de los controles (Fluconazol 25 ug y DMSO) frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

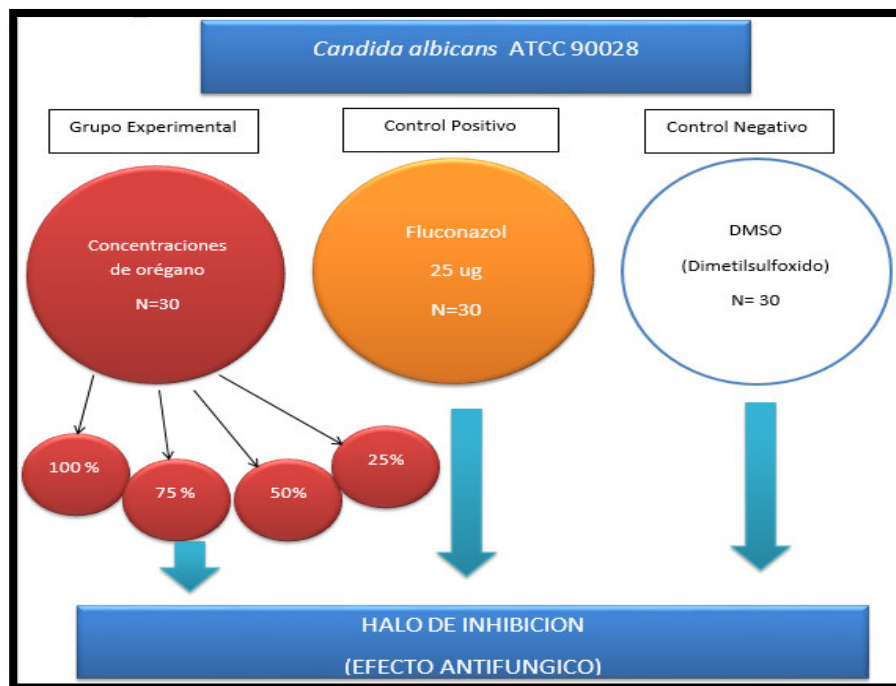


FIGURA N° 1: GRUPOS DE ESTUDIOS

2.1.5 VARIABLES:

2.1.5.1 Variable dependiente:

Efecto antifúngico del aceite esencial de *Origanum vulgare*: Inhibición del desarrollo del hongo debido al aceite esencial extraído por el método de destilación por arrastre con vapor de agua (**Anexo N°2**).

2.1.5.2 Variable independiente:

Concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare*: Son las diferentes concentraciones expresada en porcentaje del aceite esencial de *Origanum vulgare*.

- Aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100%
- Aceite esencial de *Origanum vulgare* al 75%
- Aceite esencial de *Origanum vulgare* al 50%
- Aceite esencial de *Origanum vulgare* al 25%

2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

La técnica que se utilizó en este estudio es la observación, además como instrumento se empleó una ficha de recolección de datos, la cual se llenó durante el estudio. (**Anexo N°3**)

2.1.7 PROCEDIMIENTO Y ANALISIS DE DATOS

2.1.7.1 Elaboración del medio de cultivo

Para este ensayo fue utilizado Mueller Hinton agar (MHA) adicionado con azul de metileno 0.5 ug/mL y glucosa al 2%, siendo la glucosa suplemento nutritivo para las

levaduras y el azul de metileno ayuda a definir los halos de inhibición. El agar Mueller Hinton fue elaborado siguiendo las pautas del proveedor y añadiendo 20 gr de glucosa por litro de medio. Posteriormente se agregó 100 ul de azul de metileno por cada litro de medio. Se esterilizó 121 °C por 15 min en autoclave para después dejar enfriar el medio y repartir en las placas⁴¹.

- **Control de Esterilidad**

Se escogió un 5% de los medios preparados al azar e incubaron la mitad del 5% a 35°C y la otra mitad 25°C durante 72 h. Solo se aceptó el lote si el porcentaje de contaminación fue inferior al 5%⁴⁵.

- **Control de Calidad de los discos.**

(Anexo N°4)

2.1.7.2 Adquisición del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano)

- **Recolección del material vegetal:**

Se recolectó 4 kilos de las hojas frescas de *Origanum vulgare* (orégano) procedentes del distrito de Carabayllo, región Lima, en bolsas de sacos harineros con el propósito de evitar su contaminación, una vez recolectadas se limpiaron con agua destilada y desinfectó con cloro 1%.

- **Clasificación taxonómica:**

Se llevó una muestra de las hojas con su flor de *Origanum vulgare* (orégano), al Museo de Historia Natural del UNMSM, donde un biólogo logró realizar la clasificación taxonómica. (Anexo N°5).

- **Adquisición del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano):**

Se llenó 3 litros de agua destilada en el equipo, luego se colocó 4 kg de hojas de “orégano” a lo largo del recipiente de metal del equipo extractor de aceite, teniendo cuidado de que las hojas no estén en contacto con el agua. Posteriormente el agua se calentó hasta alcanzar la temperatura de ebullición, por lo que el vapor de agua arrastró

el aceite esencial. Luego este se depositó en un embudo de separación, dejando reposar hasta obtener la división del extracto y el agua, además se procedió a eliminar las trazas de agua en presencia de sulfato sódico. El aceite obtenido fue almacenado en un frasco ámbar en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

- **Dilución del aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano):** Una vez obtenido el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) se procedió a hacer diluciones con dimetilsulfoxido (DMSO) como solvente.
 - ✓ Concentración al 75%, 2 ml de aceite esencial de *Origanum vulgare* con DMSO en proporción 3:4
 - ✓ Concentración al 50%, 2 ml de aceite esencial de *Origanum vulgare* con DMSO en proporción 1:2.
 - ✓ Concentración al 25%, 2 ml de aceite esencial de *Origanum vulgare* con DMSO en proporción 1:4.

***Candida albicans* ATCC 90028**

2.1.7.3 Ensayo con *Candida albicans* ATCC 90028: Se manipuló una colección de cultivo estándar de *Candida albicans* ATCC 90028, según el manual del CLSI M44-A⁴¹

Reconstitución de *Candida albicans* ATCC 90028: Para reconstituir esta levadura se sembró en Agar sangre, incubando a 35°C por 24 horas. Después fue realizado otro repique en el medio de ASD e incubó nuevamente por 24 horas a 35°C

Determinación de *Candida albicans* ATCC 90028: Se determinó la identidad de esta levadura empleando la coloración Gram, luego se sembró en CHROMagar a 35°C por 24-48 horas y se realizó la prueba del tubo germinativo⁴⁶

Estandarización del inóculo: Fue realizado suspendiendo las colonias de 24 h de desarrollo en un tubo con 0.85% de suero fisiológico estéril ajustando a una turbidez semejante al 0,5 de la escala Mc Farland, conteniendo una concentración aproximada de 1×10^6 - 5×10^6 UFC/mL⁴¹.

Inoculación de las placas: Con ayuda de un hisopo estéril se embebió y rotó contra las paredes del tubo. Se sembró uniformemente en tres direcciones sobre una placa Petri de 90x15 mm conteniendo Agar Mueller-Hinton con 2% de glucosa. Se dejó en reposo 15 min⁴¹.

2.1.7.4 Prueba del efecto antifúngico

Aplicación de los discos: Para determinar la susceptibilidad de las cepas estudiadas se utilizó el método de difusión de discos de Kirby y Bauer, modificada por la Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)⁴¹. Previamente se siguió el procedimiento realizado por Maravi G¹³, se esterilizaron los discos de papel Whatman N°1 del tamaño de seis mm, luego en presencia de unas pinzas se colocaron sobre cada medio de cultivo los discos de Fluconazol 25 ug proveniente de una casa comercial, cuatro discos impregnado con el aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100% (15 ul), al 75%(15 ul), al 50% (15 ul) y al 25% (15 ul). Además, se agregó un disco de papel impregnado con Dimetilsulfoxido (15 ul). Todas las placas se mantuvieron en la misma posición por un periodo de 10 minutos (**Anexo N°6**).

Incubación: Posteriormente las placas se voltearon de posición y se incubaron a una temperatura de 35°C durante un día completo.

Anotación de resultados: Pasado unas 24 horas de incubación se continuo con la medición de los halos inhibitorios en mm de cada disco ocasionado por el efecto antifúngico de las sustancias experimentales. Estos se midieron con un Vernier y se escribieron en una ficha de recolección de datos.

2.1.7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Estadística descriptiva

Los datos se resumieron utilizando las siguientes medidas estadísticas, según sea la naturaleza de la variable: Medias y desviación estándar para variables numéricas y frecuencias y porcentajes para variables categóricas.

Estadística analítica

Para efectos del análisis, el *outcome* fue el halo de inhibición obtenido con cada uno de los tratamientos especificados. De este modo, se utilizó la prueba de ANOVA para muestras relacionadas para comparar las medias entre las concentraciones distintas del aceite de orégano (25%, 50%, 75% y 100%), el control negativo (DMSO) y el control positivo (Fluconazol). En caso de detectarse una diferencia significativa, se utilizó la prueba post hoc de HSD Tukey para realizar comparaciones por pares entre las medias de los grupos. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS versión 23 con una confianza del 95% ($\alpha=0.05$).

2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El uso de la cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 y la realización de este proyecto contó con el permiso del servicio de microbiología ‘‘Dr. William Flores Sáenz’’ del INSN, para ello se realizó los tramites respectivos al Comité de Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN) (**Anexo N°7**).

2.1.9 BIOSEGURIDAD

Durante manipulación con el material biológico se usó equipo de protección personal y al finalizar el trabajo se siguieron las pautas de desecho según el manual de bioseguridad⁴⁷.

CAPITULO III: RESULTADOS

3.0 RESULTADOS

Con la finalidad de determinar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente a *Candida albicans* ATCC 90028 se obtuvo lo siguiente.

TABLA N° 1: EFECTO ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* AL 100%, 75%, 50%, 25%, DMSO Y FLUCONAZOL

Sustancias experimentales	Presencia de halo de inhibición	Media (mm)	Desviación estándar	CV (%)
Aceite esencial de <i>O.vulgare</i> 100%	Presenta	27.97	0.91	3.3
Aceite esencial de <i>O.vulgare</i> 75%	Presenta	21.48	0.86	4.5
Aceite esencial de <i>O.vulgare</i> 50%	Presenta	8.83	1.05	11.8
Aceite esencial de <i>O.vulgare</i> 25%	Presenta	7.93	1.02	12.8
Control negativo DMSO*	No presenta	6.00	0.00	0
Control positivo Fluconazol 25 ug	Presenta	28.57	0.68	2.3

***DMSO: Dimetilsulfoxido**

En la tabla N°1 se muestra que todas las sustancias experimentales dieron halo de inhibición, excepto el control negativo DMSO. En consecuencia, el mayor halo inhibitorio promedio fue producido con el aceite esencial de *Origanum vulgare* en la concentración de 100% (27.97 mm), seguido de las concentraciones al 75%(21.48 mm), 50%(8.83 mm) y 25%(7.93 mm). Mientras que el control positivo fluconazol

25 ug obtuvo un halo promedio de 28.57 mm y finalmente el control negativo DMSO (Dimetilsulfoxido), 6 mm en todas las repeticiones lo que representa el diámetro del disco. Además, se evaluó la reproducibilidad de la técnica del ensayo mediante el coeficiente de variación porcentual presentando el aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100% una variación 3.3%, seguido del aceite esencial de *Origanum vulgare* al 75% con un 4.5% de variación, mientras que las concentraciones de este aceite al 50% y 25 % tuvieron una variación de 11.8% y 12.8%. Por otro lado, el control positivo, Fluconazol 25 ug, presentó una variación de 2.3 %.

Por consiguiente, al presentarse más de dos grupos de estudios se realizó la prueba estadística de ANOVA para determinar si las medias de las cuatro diluciones del aceite esencial de orégano, Fluconazol y DMSO son distintos entre sí. Al 95% de confianza se obtuvo un $p = 0.00$ (**Estadísticamente significativo**).

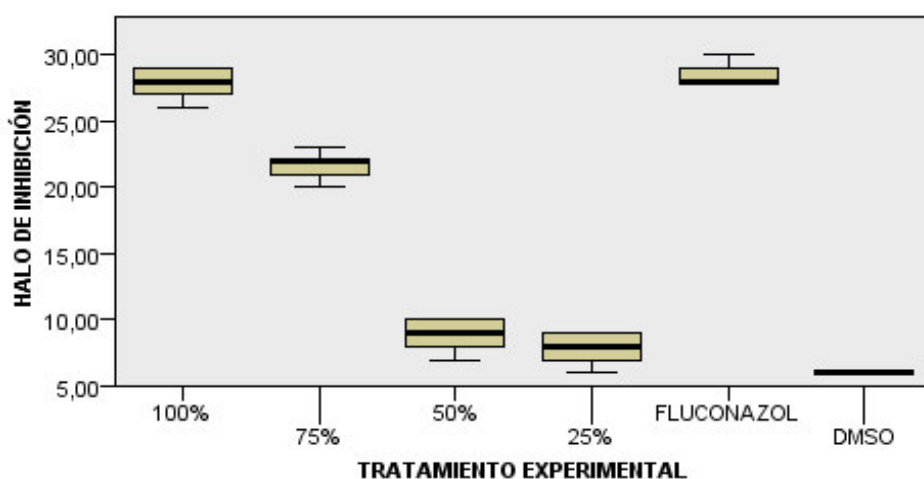


FIGURA N°2: EFECTO ANTIMICÓTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* AL 100%, 75%, 50%, 25%, DMSO Y FLUCONAZOL (25ug) EN CEPA DE *Candida albicans* ATCC 90028

En la figura N°7 se puede observar que, dentro de las sustancias experimentales empleadas, el aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100% y fluconazol 25ug presentaron mayor halo de inhibición, alcanzando las medianas de los diámetros valores cercanos, esto fue seguido de las concentraciones de *Origanum vulgare* al

75%, 50% y 25%. Mientras que el control negativo DMSO no presenta ningún tipo de halo.

TABLA N°2: COMPARACIONES MULTIPLES DE HSD TUKEY

COMPARACIONES MÚLTIPLES				
Variable dependiente: Halo de inhibición				
(I) TRATAMIENTO EXPERIMENTAL		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
HSD	100%	75%	6,487*	.213
		50%	19,143*	.213
		25%	20,043*	.213
		FLUCONAZOL	-.600	.213
		DMSO	21,967*	.213
	75%	100%	-6,487*	.213
		50%	12,647*	.213
		25%	13,547*	.213
		FLUCONAZOL	-7,087*	.213
		DMSO	15,480*	.213
	50%	100%	-19,143*	.213
		75%	-12,647*	.213
		25%	,900*	.213
		FLUCONAZOL	-19,743*	.213
		DMSO	2,833*	.213
Tukey	25%	100%	-20,043*	.213
		75%	-13,547*	.213
		50%	-,900*	.213
		FLUCONAZOL	-20,643*	.213
		DMSO	1,933*	.213
	FLUCONAZOL	100%	.600	.213
		75%	7,087*	.213
		50%	19,743*	.213
		25%	20,643*	.213
		DMSO	22,567*	.213

Luego de determinar que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos, fue realizado la prueba post hoc de Tukey, tal como se puede

observar en la tabla N°2. De este modo, con el objetivo de determinar en qué grupos de pares existe tal diferencia de medias, el aceite esencial de orégano al 100% comparado con las concentraciones de los aceites esenciales de orégano al 75%, 50% y 25% fueron estadísticamente significativo $p=0.00$, con una diferencia de medias positiva para el aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100%. Al comparar el control positivo fluconazol 25 ug frente a las diversas diluciones del aceite esencial al 75%, 50% y 25% presentaron diferencia estadísticamente significativa $p=0.00$, con una diferencia de medias positiva para el fluconazol 25 ug. Por otra parte, cuando se comparó la concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100% con el control positivo fluconazol 25 ug fue **estadísticamente no significativo $p=0.06$** ; sin embargo, el fluconazol 25 ug presentó una diferencia de media superior al aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100%.

Así mismo, al realizar las comparaciones entre grupos experimentales con el control negativo DMSO en todos los casos mostró diferencia estadísticamente significativa $p=0.00$.

CAPITULO IV: DISCUSIÓN

4.0 DISCUSIÓN

El Perú es un país con una gran diversidad de plantas medicinales debido a la presencia de los diversos pisos ecológicos, presentando modificaciones de los metabolitos secundarios en los aceites esenciales. Es por ello que con la finalidad de determinar el poder antifúngico del aceite esencial de *Origanum vulgare*, se recolectaron las hojas de esta planta en el distrito Carabayllo, provincia Lima, la cual se encontraba a una altitud de 500 msnm, realizándose un estudio de esta planta herbácea procedente de otra región.

El aceite esencial del orégano obtenido se almacenó en un contenedor ámbar a refrigeración evitando la oxidación de los compuestos químicos presentes en este. La preparación *in house* de los discos se siguieron según los ensayos propuesto por Maravi¹³, Villavicencio¹⁵ y Rodero⁴⁸ quienes lo realizaron en papel filtro Whatman N° 1, siguiendo posteriormente la metodología del CLSI de disco difusión según el manual M44 A.

Se realizó una prueba piloto con 15 repeticiones para determinar el volumen del aceite esencial de *Origanum vulgare* en cada disco. Eligiendo la cantidad de 15 μ l por generar un halo de inhibición visible que no se superponga con las otras concentraciones. Así se obtuvieron los siguientes halos de inhibición del Aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100% (27.97 mm), 75% (21.48 mm), 50% (8.83 mm) y 25% (7.93 mm). Además, se midió el coeficiente de variación porcentual para determinar la reproducibilidad de la técnica, presentando el aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100% y 75% una baja variación de 3.3% y 4.5% correspondientemente, mientras que las concentraciones del aceite al 50% y 25 % tuvieron la mayor variación 11.8% y 12.8% respectivamente, dado que fueron las concentraciones más diluidas con DMSO, no teniendo tal vez una buena difusión en el medio de cultivo. Por otro lado, el disco de fluconazol 25 μ g presentó la menor variación 2.3 %, dado que era un disco comercial.

Al realizarse la prueba estadística de ANOVA se determinó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.00$) entre las medias de las concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100%, 75%, 50% y 25 %, fluconazol 25 ug y DMSO, realizándose luego la prueba post hoc HSD Tukey, en donde se determinó que el aceite esencial en estado puro con el fluconazol 25 ug presentaron similar media. Sin embargo, el fluconazol presentó una diferencia de media superior (0.600) con respecto al aceite esencial de *Origanum vulgare*, además de las diluciones al 75%, 50%, 25% con diferencia de media superior en 7.08, 19.74 y 20.64 respectivamente.

Según el estudio realizado por Maravi¹³, utilizan una cantidad de 10 ul del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) en *Candida albicans* ATCC 90028 empleando el método de disco de difusión. Concluyendo que *Origanum vulgare* al 100% alcanzó mayor efecto antifúngico (56.25 mm) en comparación del control Nistatina (13.21 mm), seguido de la concentración al 50% (23.67 mm). Contrariamente a lo esperado en este estudio empleando un volumen mayor de 15 ul del aceite esencial al 100%, fue obtenido un halo inhibitorio promedio inferior de 27.97 mm, mientras que a la concentración al 50% se obtuvo un halo promedio de 8.83 mm. Esto posiblemente se deba a la diferencia del piso ecológico, debido a que esta planta era proveniente de Ayacucho (3300 msnm), mientras que en este ensayo provenía de Lima (500 msnm). Además, según autores como Arcilla-Lozano²⁶, Flores²⁸ y Acevedo³⁵ la composición, cantidad y calidad de los metabolitos químicos en el aceite esencial del orégano depende de ciertos factores, tales como: las condiciones climáticas, la altitud, la temporada de cosecha y el estado de crecimiento del cultivo.

Por otro lado, Villavicencio¹⁵ evaluó el efecto antifúngico de cuatro biovariedades de orégano procedentes de las regiones de Arequipa, Jauja y Tacna frente a la cepa control *Candida albicans* ATCC 10231. Demostrando que el aceite esencial de *Origanum vulgare* procedente de la región de Tacna obtuvo mayor efecto antifúngico (24, 86 mm) comparado con los aceites esenciales proveniente de Arequipa: *Origanum intercedens* (22.05 mm), *Origanum majoricum* (20.86 mm) y el procedente de Jauja: *Origanum vulgare* (12.00 mm); sin embargo, este no fue suficiente para ser superado

por el control positivo Miconazol 20mg/g (36, 29 mm). Por lo que resulta importante destacar que los resultados de esta investigación superan al presentado por Villavicencio, debido el empleo de *Origanum vulgare* al 100% procedente de Lima se obtuvo un halo promedio de 27.97 mm, siendo superior el efecto antifúngico presentado por el aceite esencial procedente de Tacna con 24.86 mm. y Jauja 12.00 mm. No obstante, cuando se compara con las diluciones de 50% y 25% los diámetros de halo de inhibición son menores en el *Origanum vulgare* procedente de Tacna y Jauja, esto posiblemente se deba a la mayor dilución del aceite esencial de *Origanum vulgare* realizado en este estudio. Por otra parte, es preciso destacar que Villavicencio realizó el estudio frente a otra cepa control, *Candida albicans* ATCC 10231. Además de ensayar con una especie de *Origanum vulgare* procedente de otras regiones, acorde con lo mencionado por otros autores.

Por otra parte, Maravi¹³ empleo nistatina como control positivo, un polieno que en su formulación convencional produce efectos tóxicos siendo administrada por vía tópica oral y cutánea, limitándose solo al tratamiento de este tipo de candidiasis⁴⁹. Villavicencio¹⁵ por su parte, emplea miconazol, el cual es un derivado imidazólico con grandes efectos adversos como: reacciones anafilácticas y toxicidad renal empleándose para uso tópico dermatológico, bucal y vaginal⁴⁹. En este estudio se empleó fluconazol 25 ug, un fármaco de primera línea contra la candidiasis presentando un amplio espectro de actividad y potencia⁵⁰, además de ser recomendado por el CLSI según el manual M44. Por otra parte, en el presente estudio se utilizó como control negativo el dimetilsulfoxido (DMSO), un disolvente orgánico utilizado a nivel industrial cuyo punto de ebullición(189°C) es superior a la temperatura de incubación en el ensayo (35°C)^{51, 52}, empleándose como diluyente del aceite esencial de *Origanum vulgare* no generando halo inhibitorio, 6 mm en todas las repeticiones.

En esta presente investigación se empleó el método de disco difusión en Agar Mueller Hinton suplementado con dextrosa, un procedimiento avalado por el CLSI. Sin embargo, Noel⁵³ evaluó mediante la técnica de difusión por pozos, el efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* y el fluconazol frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Es así, que encontró que el efecto sinérgico del fluconazol y orégano es

elevado, similar al de orégano solo. Siendo este incremento de 81.71 mm a 84.98 mm. Este fenómeno genera que ambos componentes produzcan un efecto mayor a diferencia de los dos agentes por separado³⁸. Así mismo, en los resultados reportado por Noel se encuentra un mayor halo de inhibición con respecto al presente estudio 81.71 mm frente a 27.98 mm respectivamente, empleando solo 2 ul del aceite esencial de *Origanum vulgare* en cada pocillo. Esta discrepancia posiblemente se deba a que el empleo de pozos permite agregar el aceite esencial directamente en el medio de cultivo, lo que permitiría una mejor difusión. Por otra parte, resultaría importante determinar la sinergia del aceite esencial del *Origanum vulgare* en cepas clínicas, además de emplear otros agentes antimicóticos para los diferentes tipos de candidiasis.

Así mismo, los resultados del presente trabajo realizado discrepan con algunos autores, debido a que tuvieron diferentes criterios cuando se ejecutó la técnica de disco difusión; tal como, Maravi¹³, Villavicencio¹⁵ y Noel⁵³ quienes emplearon el agar Mueller-Hinton siguiendo el manual M2 recomendado para bacterias. Siendo importante recalcar que la CLSI en el manual M-44 A, recomienda el Agar Mueller-Hinton suplementado con Dextrosa para la evaluación antifúngica. Otro aspecto importante a considerar es que algunos de autores utilizan la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, mientras que en este estudio se utilizó la cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 que similar al anterior es una cepa de referencia para evaluar los diámetros generados por el Fluconazol. Por otro lado, tenemos que el aceite esencial de *Origanum vulgare* procedente de diferentes pisos ecológicos trae como consecuencia la obtención de distintos halos inhibitorios.

CAPITULO V:

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES:

- Acorde al procedimiento del manual M44-A, para realizar el estudio de susceptibilidad antimicótica, el aceite esencial de *Origanum vulgare* presentó efecto antifúngico en cepa de *Candida albicans* ATCC 90028, siendo la concentración al 100% (27,97 mm) la que generó un mayor halo promedio a comparación de las concentraciones de 75% (21.48 mm), 50% (8.83 mm) y 25% (7.93 mm).
- Al 95% del nivel de confianza estadística se comprobó mediante la prueba de ANOVA y prueba post hoc de comparaciones múltiples de HSD Tukey, que las medias de ambos grupos: el aceite esencial del *Origanum vulgare* al 100% y fluconazol 25 ug fueron iguales; sin embargo, el fluconazol 25 ug presentó una diferencia de media superior con respecto al aceite esencial de *Origanum vulgare* al 100%.

5.2 RECOMENDACIONES:

- Investigar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Origanum vulgare* en cepas clínicas con el fin de demostrar que existe susceptibilidad antimicótica en una población heterogénea.
- Realizar investigación con otras especies de *Candida*, especialmente en *Candida krusei* quien es intrínsecamente resistente al fluconazol.
- Estudiar otras levaduras patógenas para el ser humano, así como también en hongos filamentosos, con el propósito de evaluar un amplio espectro del efecto antifúngico del *Origanum vulgare*.
- Realizar estudios posteriores en modelos animales, para demostrar in vivo el efecto antimicótico del aceite esencial de *Origanum vulgare*.
- Se recomienda identificar y aislar los principios activos del aceite esencial de *Origanum vulgare* dado que este estudio evaluó todo el extracto procedente de las hojas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Magariños Losada MM, Rodríguez Pascual C. Candidiasis. [citado el 3 de julio de 2017]; Disponible en: https://www.segg.es/tratadogeriatria/PDF/S35-05%2044_III.pdf
- 2 Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horizonte medico* 2018. 18(1):75-85.
- 3 Figueras C, Heredia CD de, García JJ, Navarro M, Ruiz-Contreras J, Rossich R, et al. Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. *Anales de Pediatría*. mayo de 2011;74(5):337.e1-337.e17.
- 4 Béjar V, Villanueva F, Guevara JM, González S, Vergaray G, Abanto E, et al. Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical Daniel A Carrión, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. *Anales de la Facultad de Medicina*. 8 de agosto de 2014;75(2):167-72.
- 5 López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Revista Biomédica* 2016;27:127–136.
- 6 Educación médica y salud. [En línea], 1984. [Fecha de acceso 15 de julio del 2017] URL [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/3199/Educaci%C3%B3n%20m%C3%A9dica%20y%20salud%20\(18\),%203.pdf?sequence=1](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/3199/Educaci%C3%B3n%20m%C3%A9dica%20y%20salud%20(18),%203.pdf?sequence=1) disponible en:
- 7 Sandoval-Vegas M, Huamán-Gutiérrez O, Oré-Sifuentes R, Loli-Ponce A, Ayala-Pío S. Efecto antioxidante y citoprotector del *Solanum tuberosum* (papa) en la mucosa gástrica de animales de experimentación. *Anales de la Facultad de Medicina*. 9 de mayo de 2011;71(3):147-152.
- 8 Guevara G JM, Guevara G JC, Guevara D JM, Béjar V, Huamán A, Valencia E, Abanto P. Evaluación del cocimiento de diferentes biovariedades de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a oxacilina. *Anales de la Facultad de Medicina*. abril de 2014;75(2):177-180.
- 9 Voigt MF, Lambrecht GC, Damé SLF, Silveira CH, Hartwig Carla. Comparación de distintas extracciones hidroalcohólicas de plantas con indicativo etnográfico antiséptico/desinfectante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Septiembre de 2011;16(3): 236-246.

- 10 Coy BCA, Eunice AG. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Junio del 2013; 18(2): 237-246.
- 11 Pimentel RE, Castillo AD, Quintana SM, Maurtua TD, Villegas VL, Díaz SC. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Revista Estomatológica Herediana*. Octubre –Diciembre del 2015; 25(3):268-277.
- 12 García LC, Alonso RS, Rodríguez MR, Martínez RA, Ramírez BP, Moreno RA. Susceptibilidad in vitro de una Cepa de *Staphylococcus aureus* Resistente a Diferentes Extractos Vegetales. *Revista Agraria -Nueva Época- Año VI*. Enero-diciembre del 2009;6(1):19-24
- 13 Maraví G. EFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE: *Menta piperita* (MENTA), *Origanum vulgare* (ORÉGANO) y *Cymbopogon citratus* (HIERBA LUISA) SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028. [Tesis bachiller].Lima, Perú. Universidad Norbert Wiener; 2012
- 14 Chavez TL, Díaz CF, Escalante RG, Estrada ME. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamericana*.2008;13(2): 45-48.
- 15 Villavicencio Gastelú JE, Moromi Nakata H, Salcedo- Moncada D, Pineda-Mejía M, Ramos Perfecto D, Zambrano de la Peña LS, et al. Efecto Antimicótico in vitro de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans*. *Odontología Sanmarquina* 2016;19(2):5-8.
- 16 Pardi G. Determinantes de Patogenicidad de *Candida Albicans*: (Revisión Bibliográfica). *Acta Odontológica Venezolana*. junio de 2002;40(2):185-192.
- 17 Castrillon Rivera LE, Palma RA, Padilla DC. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Revista Mexicana*. Enero-Febrero 2005; 49(1):12-27
- 18 Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. el 15 de febrero de 2013;4(2):119–28.
- 19 Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*. el 1 de enero de 2013;62(1):10–24.
- 20 Dabas PS. An approach to etiology, diagnosis and management of different types of candidiasis. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 2013;4(6):63–74.

- 21 Tapia P Cecilia. Candidiasis vulvovaginal. Revista chilena de infectología. Agosto 2008; 25(4): 312-312.
- 22 Casalnuovo I.A, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2004; 8:69-77.
- 23 Vicente-Herrero MT, Teradillos-Garcia MJ, Ramirez Iñiguez de la Torres MV, Capdevila-García LM, López Gonzales AA, Riera Routon K. Especies, hierbas medicinales y plantas. Usos en medicina. Revisión de la bibliografía científica (Medline). Medicina Balear 2013; 28 (2): 35-42
- 24 Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, Gupta A. Phytochemistry of medicinal plants. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry . 2013;1(6):168-182
- 25 Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. Molecules. el 1 de enero de 2017;22(1):1-55.
- 26 Arcila-Lozano CC, Loarca-Pina G, Lecona S, Gonzales de Mejía E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos latinoamericanos de nutrición. Marzo 2004. 54(1):100-111
- 27 Peredo-Luna. H.A, Palou-Garcia. E, Lopez-Malo.A .Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2009; 24-32.
- 28 Flores Hernández A, Hernández Herrera JA, López Medrano I, Valenzuela Nuñez LM, Martínez Salvador M, Madinaveitia Ríos LM. Producción y extracción de aceite de orégano (*lippia graveolens kunth*) bajo cultivo en la comarca lagunera. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. Vol. 2(3):114-120.
- 29 Morales R. El orégano, un condimento tradicional. Etnobotánica [Internet]. España. Noviembre 1999[consultado el 25 julio 2017]. Disponible en <http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/pubinv/RMV/211QUERCUS.pdf>
- 30 Ficha técnica Cultivo del orégano. Soluciones prácticas ITDC. [Internet]. Perú. [citado 2 de julio de 2017]; Disponible en: www.solucionespracticas.org.pe/Descargar/597/5230.
- 31 United State Department Of Agriculture. Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Origanum vulgare* L. [cited 2017 Jul 17]; Available from:<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=ORVU&display=31>

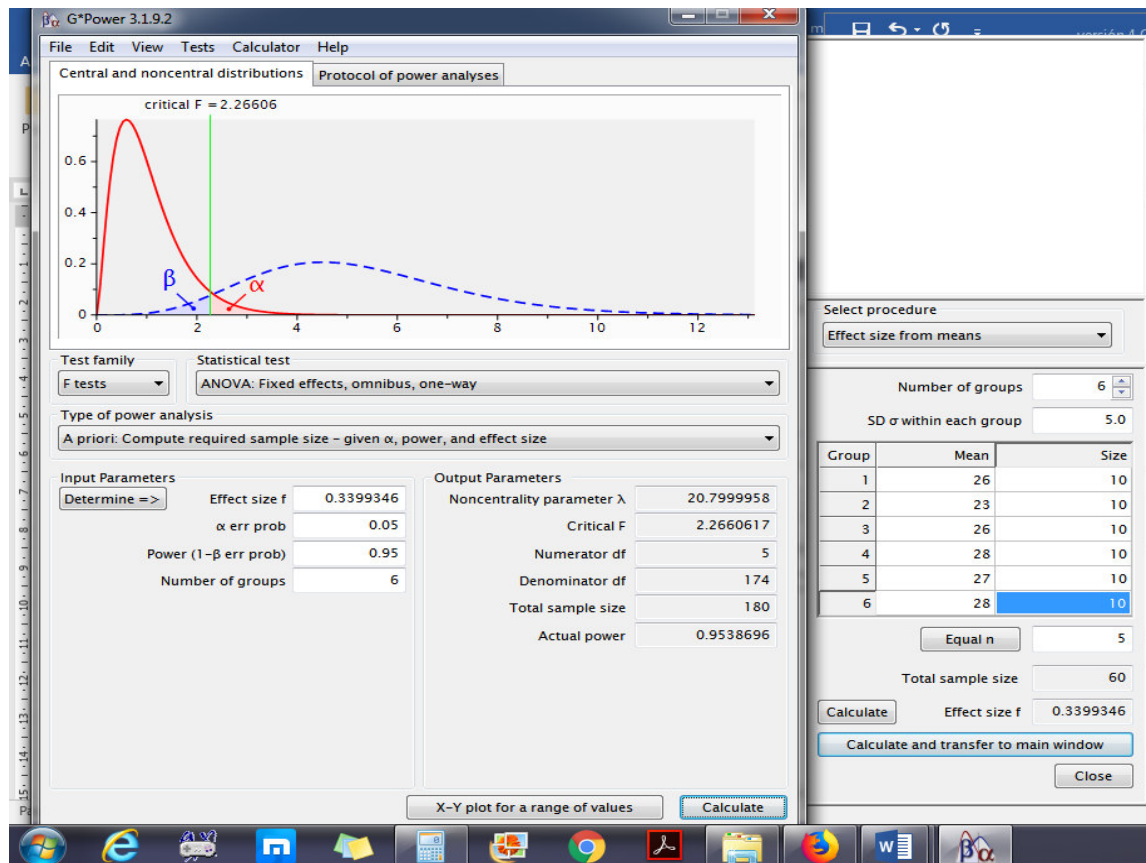
- 32 Acosta L, Menéndez R, Fuentes V, Rodríguez C, Hechevarria I, Carballo C. Instructivo técnico del cultivo de *plecthranthus amboinicus* (lour.) spreng (orégano frances). Revista cubana de plantas medicinales.1998;3(1):51- 53.
- 33 Muñoz Centeno LM. Plantas medicinales españolas: *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae)(orégano). 2002 [citado el 2 de julio de 2017]; Disponible en: http://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/3936/27_MunozCenteno.pdf
- 34 Hobincu M, Muneanu N, Falticeanu M. Preliminary studies on species agrobiology *Origanum Vulgare*. Universitatea de Stiinte Agricole Și Medicină Veterinară Iași. Seria Agronomie. 2010; 53(1):228–233.
- 35 Acevedo D, Navarro M, Monroy L. Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). Información tecnológica.2013. 24 (4):43-48
- 36 Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2015 Feb 23;55(3):304–18.
- 37 Utlea A, Kets Edwin, Hoekstra M, Smid Eddy. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Archives of microbiology Octubre 2010. 174(4):233-238
- 38 Garcia –Garcia R.M y Palou Garcia E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Temas selectos de Ingenieria de Alimentos 2-2 (2008); 41-51. [Internet]. [citado 28 de junio de 2018]. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf)
- 39 Crocoll C, Asbach J, Novak J, Gershenzon J, Degenhardt J. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. Plant Molecular Biology. August 2010. 73(6): 587-603
- 40 Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology. Septiembre 2001. 91(3): 453-462.
- 41 Cantón Lacasa E, Martin Mazuelos E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38A y M44-A). Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2010.15a1-15b-6
- 42 Tapia C. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Revista chilena de infectología. 2009 Apr;26(2):144–50.
- 43 Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. J Antimicrob Chemother. 2008 Jan;61 Suppl 1:i13-18.

- 44 Rodríguez-Tudela J.L, Arendrup MC, Barchiesi F, Billie J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M et al. EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Abril 2008. 14(4): 398-405.
- 45 Arévalo Morales P, Torres Lana A, Cárdenes Pereda D. Control de calidad. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2010 [citado el 23 de junio de 2018]; Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo18.pdf>.
- 46 Ramírez Ponce R, Díaz Tello J. Microbiología clínica básica. 1er edición Febrero 2017.
- 47 OMS. Manual de Bioseguridad 3era Edición [Internet]Ginebra. [Consultado 28 de diciembre 2018]. Disponible en https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguiridad_laboratorio.pdf
- 48 Rodero L, Cordova S, Vivot W, Campo M, Corfield, Olguin C et al. Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de Candida spp. Revista argentina de microbiología. Julio-septiembre 2006. 38(3);155-163
- 49 Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifúngicos para uso sistémico. Enfermedad Infecciosa de Microbiología Clínica. 2009;27(6):353–362.
- 50 Martín-Aragón S, Benedí J. Antimicóticos dermatológicos. Farmacia Profesional. Julio-Agosto de 2004;18(7):38-49. 51 Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. enero de 2011;30(1):41-50.
- 51 Gaspar M, Bovaira M, Carrera-Hueso FJ, Querol M, Jiménez A, Moreno L. Efectividad de un protocolo de tratamiento tópico con dimetilsulfóxido al 50% en el síndrome de dolor regional complejo tipo 1. Farmacia Hospitalaria [Internet]. septiembre de 2012 [citado 28 de junio de 2018];36(5):385-91. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130634311002595>
- 52 Fichas Internaciones de Seguridad Química. Dimetilsulfoxido. [Internet]. España [citado 18 de diciembre del 2018]; Disponible en: http://reactivosmeyer.com.mx/pdf/reactivos/hds_1210.pdf
- 53 Martell N, Estefania C. Efecto sinérgico in vitro del fluconazol y el aceite esencial de origanum vulgare frente a candida albicans. Universidad Nacional de Trujillo [Internet]. 2017 [citado 23 de junio de 2018]; Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/9716>

ANEXOS

ANEXO N°1

PROGRAMA G*POWER 3.1



ANEXO N°2

OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable Dependiente	Definición conceptual	Indicador	Escala	Medición
Efecto antifúngico – <i>in vitro</i> – del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano)	Inhibición en el desarrollo del hongo debido al aceite esencial extraído por el método de destilación por arrastre con vapor de agua.	Halo de inhibición formado alrededor del disco embebido con el aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano)	Discreta	mm
Variable Independiente	Definición conceptual	Indicador	Escala	Medición
Concentración del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	Se encuentra expresada en el porcentaje en el cual el aceite esencial de orégano puro será diluido con Dimetilsulfoxido (DMSO)	Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> al 100%	Nominal	ml
		Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> al 75%		
		Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> al 50%		
		Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> al 25%		

ANEXO N°3

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Medida de halo de inhibición en placa agar Mueller-Hinton con 2% glucosa

Fecha : / /

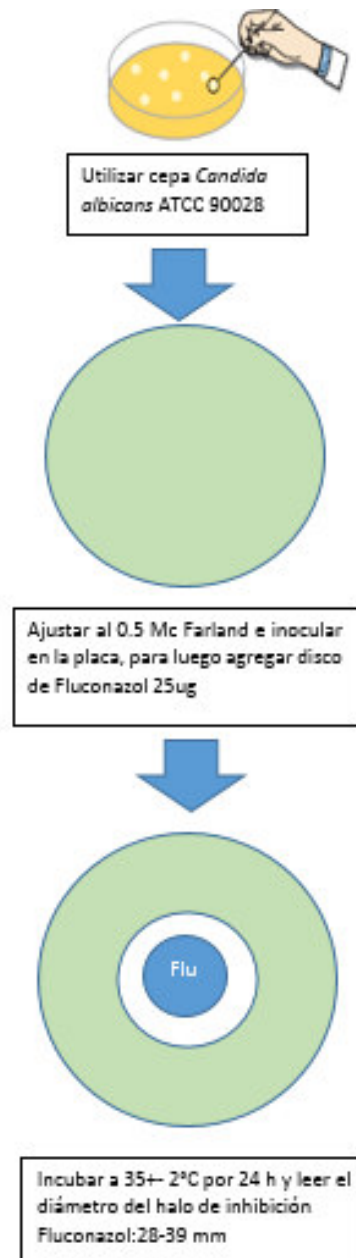
T° de incubación:

Tiempo de incubación:

<i>Candida albicans</i> ATCC90028 24 h	Halo de inhibición en mm					Fluconazol
	Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>					25 ug 24h
	100%	75%	50%	25%	DMSO	
1						
2						
3						
4						
5						
.						
.						
.						
.						
.						
.						
.						
.						
.						
.						
.						
.						
.						
30						



ANEXO N°4

CONTROL DE CALIDAD DEL DISCO FLUCONAZOL 25 ug




ANEXO N°5

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Origanum vulgare*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N° 219-USM-2017

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (hojas secas) recibida de Víctor Hugo GARROTE GUTIERREZ, estudiante de la Facultad de Tecnología Médica-Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: *Origanum vulgare* L., y tiene la siguiente posición taxonómica según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

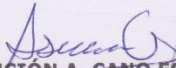
GENERO: *Origanum*


ESPECIE: *Origanum vulgare* L.

Nombre vulgar: "orégano"
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere pertinente.

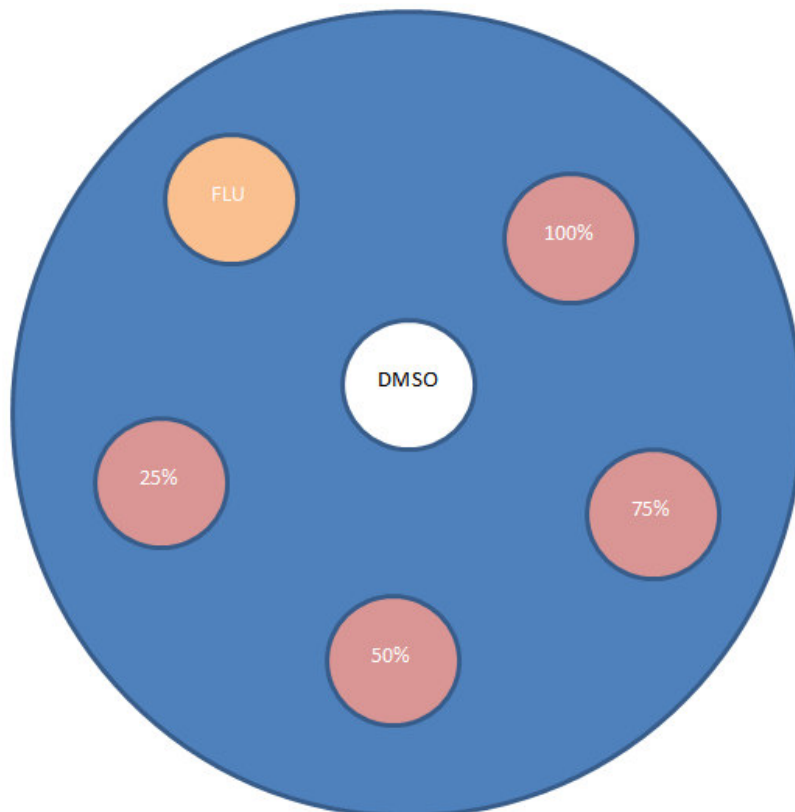
Lima, 06 de octubre de 2017


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ANEXO N°6

DISPOSICIÓN DE DISCOS DE LAS SUSTANCIAS EXPERIMENTALES



Discos	
Fluc	Fluconazol 25 ug
100%	A.E* <i>Origanum vulgare</i> puro
75%	A.E* <i>Origanum vulgare</i> diluido 3:4
50%	A.E* <i>Origanum vulgare</i> diluido 1:2
25%	A.E* <i>Origanum vulgare</i> diluido 1:4
DMSO	Dimetilsulfoxido

*A.E: Aceite Esencial

ANEXO N°7

APROBACIÓN DEL PROYECTO POR PARTE DEL COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INSN

 **PERÚ** **MINISTERIO DE SALUD** **INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO** "Decenio de la Igualdad de oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

Lima, 23 de mayo de 2018

OFICIO N° 0124-2018-CIEI-INSN

Sr.
VÍCTOR HUGO GARROTE GUTIERREZ
Investigador Principal del Proyecto **PI-03/18**
Presente.-

Asunto: Se aprueba el Proyecto de Investigación **PI-03/18**, antes titulado: "Efecto antifúngico-in-vitro-del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre cepas de *Candida* spp. Provenientes de aislados clínicos de pacientes del Instituto Nacional de Salud del Niño", **ahora titulado:** "Efecto antifúngico *-in vitro-* del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Candida albicans* ATCC 90028"

Registro:
Reg. OEAIDE-0110-2018
Reg. UDISEÑO-009-2018
Reg. CIEI-045-2015

De mi mayor consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y asimismo informarle que con relación al Proyecto de Investigación **PI-03/18**, titulado: "Efecto antifúngico *-in vitro-* del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Candida albicans* ATCC 90028",

El Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud del Niño, en su Sesión N° 10-2018, de fecha 23 de mayo de 2018, acordó aprobar el Proyecto de Investigación.


La vigencia de esta aprobación es desde el 23 de mayo de 2018 al 22 de mayo de 2019.

Los trámites para su renovación deberán iniciarse 30 días antes de su vencimiento.

Sin otro particular, quedo de Ud.,

Atentamente,


PRESIDENTA MARÍA DEL CARMEN GASTAÑAGA RUÍZ
Presidenta del Comité Institucional de Ética en Investigación,
Instituto Nacional de Salud del Niño



www.insn.gob.pe | Av. Brasil 600
Breña, Lima 5, Perú
T (511) 330-0066

FOTOGRAFIAS

FOTO N°1

PLANTA HERBÁCEA DE *Origanum vulgare*



FOTO N°2

EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare*



FOTO N°3

MATERIALES Y REACTIVOS

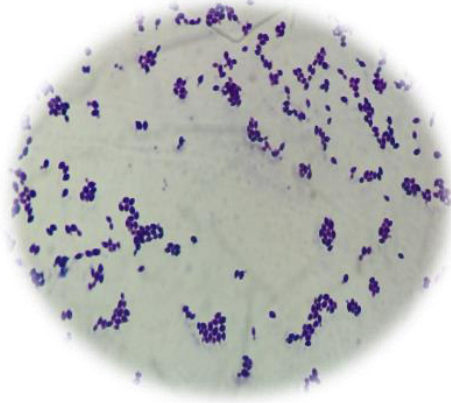


FOTO N°4: *Candida albicans* ATCC 90028



FOTO N°5: IDENTIFICACIÓN FUNGICA

Gram



CHROMagar™ *Candida*



Tubo germinativo



FIGURA N°6:

PREPARACIÓN DEL MEDIO

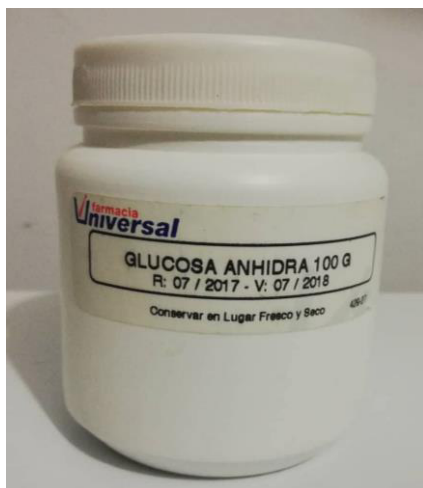


FIGURA N°7:

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

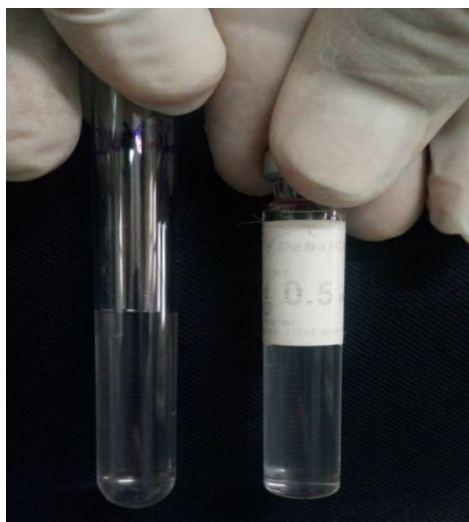


FIGURA N°8:

INOCULACIÓN DE LAS PLACAS



FIGURA N°9:
PRUEBA DEL EFECTO ANTIFÚNGICO



FIGURA N°10:

HALOS DE INBICIÓN DE LAS SUSTANCIAS EXPERIMENTALES



SUSTANCIAS EXPERIMENTALES

FLU 25	Fluconazol 25 ug
100%	A.E*. <i>Origanum vulgare</i> al 100%
75%	A.E*. <i>Origanum vulgare</i> al 75%
50%	A.E*. <i>Origanum vulgare</i> al 50%
25%	A.E*. <i>Origanum vulgare</i> al 25%
DMSO	Dimetilsulfoxido

*A.E: Aceite esencial